

방광근 조절에 관여하는 척수신경원의 세분화 방법

The Subdivision of the Spinal Neurons for Detrusor Function

Hyung Jin Jeon, Hye Young Lee, Ji Yeun Noh¹, Chang Hee Hong², Jang Hwan Kim, Sang Won Han

From the Department of Urology, Urological Science Institute and ¹Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul, and the ²Department of Urology, Hallym University College of Medicine, Chuncheon, Korea

Purpose: No ideal method for subdividing and assessing changes in neurons of the spinal cord during specific conditions has been established. We attempted to develop a method for subdividing spinal neurons using immunohistochemical and fluorescent staining, which is an important key towards understanding the mechanism of reflex voiding.

Materials and Methods: Thirty Sprague-Dawley rats, weighting 200-300g, were divided into five groups. A cystometrogram was performed during saline or acetic acid instillation. We identified the neuronal pathway associated with the detrusor by injecting a pseudorabies virus (PRV) into the detrusor muscle and inspecting the changes in relation to different time sequences. An immunohistochemical staining method was used to stain the fos-protein encoded by the c-fos gene. Immunofluorescent staining was performed to evaluate changes in the neurons in relation to the voiding reflex, and the neurons then subdivided.

Results: We confirmed pseudorabies virus (PRV) infection of the cells in the sacral parasympathetic nucleus through immunohistochemical staining two days after injection. On detection of an increase in c-fos positive cells after dividing the c-fos positive area of the L6 and S1 spinal cord into 4 sections, significant increases were observed in the sacral parasympathetic nucleus (SPN) and dorsal commissure (DCM). Double staining was performed to detect the neurons associated with the voiding reflex in the SPN and DCM areas showing overexpression of c-fos.

Conclusions: The establishment of a method for detecting morphological changes, and subdividing neurons by immunohistochemical and fluorescent staining, may provide an important key towards understanding the mechanism of various neuromodulations of clinically applied treatments. (Korean J Urol 2005;46:487-494)

Key Words: Reflex, Neurons, Pseudorabies virus, C fos proteins

대한비뇨기과학회지
제 46 권 제 5 호 2005

연세대학교 의과대학
비뇨기과학교실, 비뇨의과학연구소,
¹BK21 의과학사업단, ²한림대학교
의과대학 비뇨기과학교실

전형진 · 이해영 · 노지연¹
홍창희² · 김장환 · 한상원

접수일자 : 2004년 7월 21일
채택일자 : 2004년 10월 26일

교신저자: 한상원
세브란스병원 비뇨기과
서울시 서대문구 신촌동 134
☎ 120-752
TEL: 02-2228-2316
FAX: 02-312-2538
E-mail: swhan@yumc.
yonsei.ac.kr

본 연구는 연세대학교 의과대학 2002년도
교수연구비에 의해 이루어졌음 (6-2002-
1064).

서 론

하부요로의 기능적 단위는 척수 (S2-S4)의 부교감 및 척신경과 흉요수 (T11-L2)의 교감신경에 의해 종합적으로 조절되며 척수배뇨반사궁에 의한 배뇨반사와 뇌간의 배뇨근-요도괄약근 조절중추, 대뇌피질의 배뇨반사억제 중추에 의

한 조절이 그 골격을 이룬다. 기본적으로 방광과 요도로부터의 지각은 교감신경, 부교감신경 및 척신경에 의해 중추 신경계로 전달되며 배뇨근에는 장력 및 신장 수용체가 풍부하게 분포되어 방광이 충만되면 자극되고 지각신호는 골반신경의 부교감신경을 통하여 척수배뇨반사 중추에 전달된다.¹ 척수에서 감각신경은 뇌로 정보를 제공하는 projection neuron, preganglionic neuron 및 운동신경원으로 정보를

제공하는 interneuron으로 전달되고 방광, 요도 및 요도괄약근 반사는 disynaptic이나 polysynaptic pathway를 통해 이루어지는데 이 과정에 하부요로기능을 조절하는 필수적인 역할을 interneuron이 담당하고 있다.²

C-fos는 중추신경계에서 fos-protein을 합성하는 proto-oncogene으로 배뇨반사에 관여하는 신경의 활성을 나타내는 표식인자로 알려져 있다.³ 특히 방광 내 acetic acid 주입은 c-fos 발현을 증가시키는 대표적인 자극물질로 지속적인 자극 2시간 후에 L6와 S1 척수에서 c-fos 양성 세포를 유의하게 증가시킨다고 하였다.⁴ 이러한 배뇨반사는 척수반사에 의해 이루어지는데 척수절단 시 배뇨반사는 100%에서 척수반사에 의해 일어난다.

C-fos는 중추신경계에서 배뇨반사에 관여하는 신경의 활성을 나타내는 유일한 표식인자로 간주되고 있지만 뇌로 전달되는 projection neuron, interneuron, preganglionic neuron에 모두 c-fos 양성으로 관찰되기 때문에 배뇨반사의 억제 경로를 확인하기에는 부족한 면이 많다. 현재까지 보고된 연구방법으로는 척수의 신경세포를 세분화하여 각 신경세포에 대한 영향을 연구할 수 없는 실정이다.^{5,6} 저자들은 척수절편의 신경세포를 세분화하는 방법을 제시하고 배뇨반사에 의한 신경원의 변화를 관찰하여 임상에서 다양하게 적용되고 있는 여러 가지 neuromodulation의 기전에 관한 연구를 하는 데 있어 중요한 정보 및 방법을 제시하여 효과적 인 임상적응을 위한 기틀을 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험군 분류

체중 약 200-300g의 성숙한 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였고 방광근에 대한 pseudorabies virus (PRV) 주입 및 방광 내 acetic acid 자극 여부에 따라 결보기 수술군 (sham operation, 4마리), 생리식염수 주입군 (4마리), acetic acid (AA) 자극군 (6마리), pseudorabies virus (PRV) 주입군 (10마리), PRV 주입 후 AA 자극군 (10마리)으로 분류하였다. 결보기 수술군은 하복부를 절개하고 방광의 정부에 catheter 삽입만을 시행하였다.

2. 실험방법

1) 방광근에 pseudorabies virus 주입: 정상 흰쥐를 enflurane을 흡입시켜 마취한 후 복부 절개를 가하고 방광을 노출시킨 다음 micropipette가 부착된 Hamilton 주사기를 사용하여 pseudorabies virus (Bartha strain, 2.6×10^8 pfu/ml)를 2μl 씩 양쪽 방광근육에 주입하였다. 이때 바이러스가 방광 밖으로 새지 않도록 주의하고 주입이 끝나면 해당 부위를 생

리식염수로 닦아낸 다음 복벽을 봉합하였다.

2) 감각신경의 활성화 및 요역동학검사: 생리식염수 주입군과 AA 자극군은 결보기 수술군과 동일한 외과적 처치 후에 polyethylene catheter (PE-50)를 통해 2시간 동안 각각 생리식염수와 1% acetic acid를 주입하였다. 이 과정에 pressure transducer를 Powerlab system (ADInstruments, Australia)에 연결하고 방광근 수축빈도 (ICI), 방광근 수축압 (MVP) 등을 확인하였다. 생리식염수 주입군에서도 같은 방법으로 요역동학검사를 시행하였다.

3) 표본제작: 흰쥐를 시기에 따라 ether를 사용하여 마취시킨 후, 2% sodium nitrate와 2% heparin을 넣은 생리식염수 용액을 심장을 통해 관류하고, 4% paraformaldehyde 용액으로 관류하여 고정된 다음 척추궁절제술을 시행하여 L6, S1 척수절편을 적출하였다. 적출된 척수는 20% phosphate buffered sucrose (pH 7.4)에 담가 24시간 고정된 후 동결절편기 (freezing microtomes, Microm, Walldorf, Germany)를 사용하여 40μm로 박절하고 L6, S1 척수에서 c-fos, PRV, choline-acetyl transferase (ChAT)에 대한 면역조직화학염색 및 형광염색을 시행하였다.

4) 면역조직화학염색 및 형광염색: 박절한 조직은 phosphate buffered saline (PBS)으로 여러 번 세척하고 3% H₂O₂ 용액으로 10분간 처리하여 내인성 peroxidase를 차단하였다. 면역조직화학염색은 c-fos와 ChAT 및 PRV에 대한 신경원의 분포 및 변화를 관찰하기 위하여 L6, S1 척수조직 절편에 각각 일차항체 rabbit anti-Fos (1:1000, Oncogene, Cambridge, USA), goat anti-ChAT (1:1000, Chemicon, Temecula, USA), rabbit anti PRV (1:10,000, 제주대)를 4°C, 12시간 처리하였다. Biotin이 부착된 이차항체에 실온에서 2시간 반응시킨 후 Diamino-benzidine (DAB) 또는 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)로 발색하였다. C-fos와 ChAT 이중형광염색은 L6, S1 척수조직 절편을 anti-Fos (rabbit anti-Fos, Oncogene, Cambridge, USA)와 goat anti-ChAT (Chemicon International, Temecula, USA)에 담가 4°C에서 18시간 반응시킨 이후에 donkey antirabbit conjugated with FITC (1/50; Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA)와 donkey antigoat conjugated with TRITC (1/50; Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA)가 포함된 cocktail에 2시간 반응시켰다. 조직을 gelatinized slide에 봉입하고 fade-retardant medium으로 덮어 epifluorescent illumination으로 관찰하였다. C-fos와 PRV 이중형광염색은 조직절편을 anti-Fos (goat anti-Fos, Cambridge, USA)와 rabbit anti-pseudorabies virus (제주대학교에서 구입)에 담가 4°C에서 24시간 반응시킨 이후에 donkey antirabbit conjugated with FITC (1/50; Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA)와 donkey antigoat conjugated with TRITC (1/50;

Jackson Immunoresearch, West Grove, USA)가 포함된 cocktail에 2시간 반응시킨다. 조직을 gelatinized slide에 봉입하고 fade-retardant medium으로 덮어 epifluorescent illumination으로 관찰하였다.

5) 표본관찰 및 분석: PRV를 사용하여 배뇨근에 관여하는 신경로를 확인하기 위해 PRV 주입 후 각각 1.5일, 2일, 2.5일, 3일, 3.5일에 희생시킨 흰쥐의 L6, S1 척수분절에 대해 면역조직화학염색을 시행하였으며 medial dorsal horn (MDH), lateral dorsal horn (LDH), dorsal commissure (DCM) 그리고 sacral parasympathetic nucleus (SPN)으로 나누어 PRV에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 PRV에 감염된 신경원의 분포 및 시간에 따른 변화양상을 확인하였다. 또한, PRV 자체에 의한 c-fos 변화를 확인하기 위하여 PRV 주입 후 3일에 제1척수분절에서 c-fos에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다.

Acetic acid 자극에 의한 감각신경의 활성화를 확인하기 위해 척수분절에서 c-fos 발현에 대한 면역조직화학염색을 시행한 후 신경세포의 분포와 수를 비교하였다. 면역조직화학염색에서 c-fos 양성을 나타내는 세포는 S1 척수분절에서 무작위로 5개를 선택하여 4개의 영역에 따라 수를 센 후 각각의 평균을 구하였다.

활성화된 신경원을 preganglionic neuron, interneuron, projection neuron으로 분류하기 위해 c-fos와 ChAT 이중 염색 및 c-fos와 PRV 이중 염색을 시행한 후 SPN 및 DCM 영역에서 이중염색에 대한 양성 신경세포의 분류 및 분포를 관찰하였다.

3. 결과의 비교분석 방법

S1 척수분절에서 c-fos 양성을 나타내는 세포의 수는 평균

값±표준편차로 표시하였다. 척수분절의 4개의 영역에 따른 차이를 분석하기 위해서 각 실험군 간의 비교는 univariate analysis of variance (ANOVA)를 사용하였고 p값이 0.01 미만을 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다. 방광근 수축빈도 (ICI), 방광근 수축압 (MVP)의 차이는 Student's t-test (unpaired)를 사용하여 비교하였고 p값이 0.05 미만을 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. Pseudorabies virus 주입 후에 배뇨근에 관여하는 신경로 고찰

L6-S1 척수분절에서 preganglionic neuron을 확인하기 위하여 ChAT를 사용한 면역조직화학염색에서 SPN에 양성을 나타내는 세포가 관찰되었다 (Fig. 1). 방광근육에 PRV를 주입한 후 1.5일, 2일, 2.5일, 3일, 3.5일에 L5, S1 척수분절에서 면역조직화학염색을 시행하였다. Virus 주입 1.5일에는 대부분의 L6, S1 척수 분절에서 virus 양성 세포를 관찰하지 못하였고 제1척수분절의 SPN 영역에 1개의 virus 양성세포가 관찰되었다 (Fig. 2A). Virus 주입 2일에는 SPN 영역에서 virus 양성 세포가 관찰되었으며 2일 이후에는 SPN, DCM, dorsal horn의 superficial laminae에서 virus 양성 세포가 증가하였다 (Fig. 2B, C).

2. 배뇨반사에 대한 요역동학검사

생리식염수를 주입하면서 시행한 요역동학검사와 acetic acid 자극 시에 시행한 요역동학검사를 비교한 결과 acetic acid 자극군에서 배뇨근 수축빈도 (ICI)가 증가하였고 배뇨근 수축압 (MVP)이 높게 나타났다 (Fig. 3).

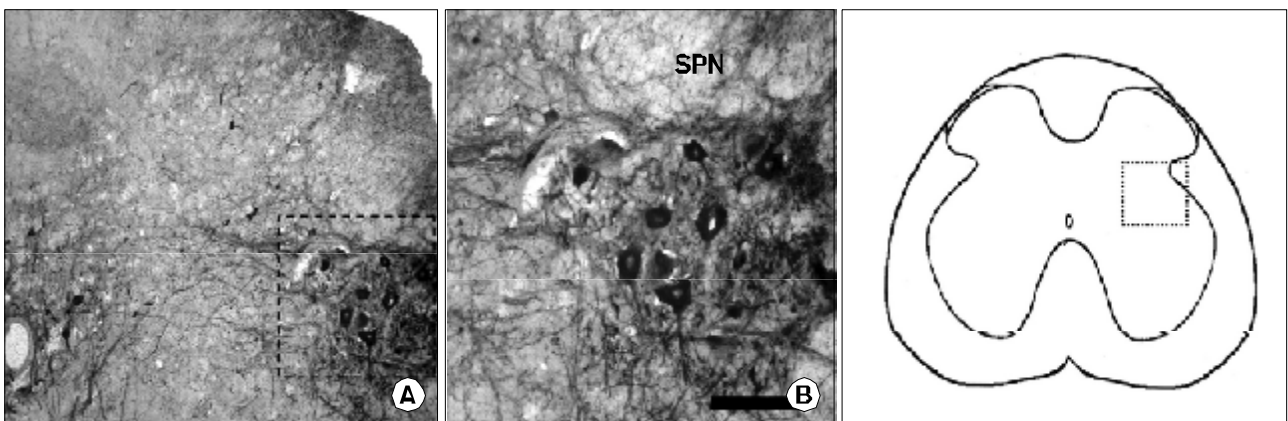


Fig. 1. Immunohistochemical staining using ChAT. We confirm preganglionic neurons in SPN region of the S1 spinal cord. ChAT: choline acetyltransferase, SPN: sacral parasympathetic nucleus (A: x100, B: x200) Bar=100µm.

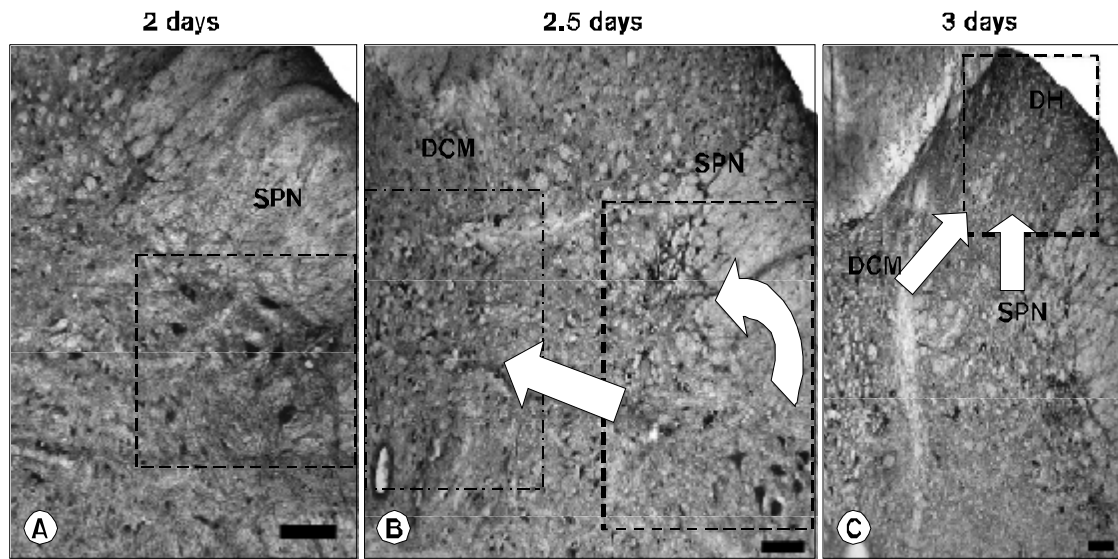


Fig. 2. Immunohistochemical staining after injection of the PRV into the detrusr muscle (A) 2.0 days of incubation. Virus infected cells are noted in the SPN region. (B) 2.5 days of incubation. Virus infected cells are noted in SPN and DCM regions. (C) 3.0 days of incubation. Virus infected cells are noted in the SPN, DCM and superficial laminae of the dorsal horn. PRV: pseudorabies virus, SPN: sacral parasympathetic nucleus, DCM: dorsal commissure, DH: dorsal horn (x100) Bar=100μm.

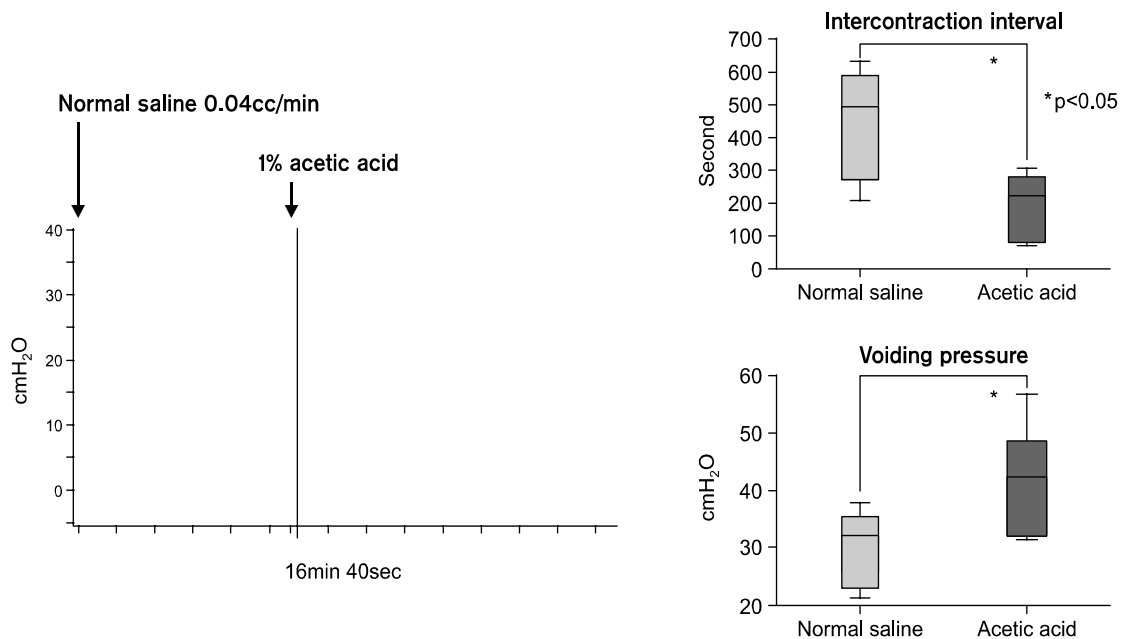


Fig. 3. Cystometry after intravesical instillation of saline or acetic acid. The urodynamic study shows increases in the frequency of voiding and the maximal voiding pressure.

3. 방광에 분포하는 감각신경의 활성화에 따른 c-fos 발현의 변화

2시간 동안 방광 내 acetic acid 자극에 의해 활성화된 c-fos 양성 신경세포를 확인하기 위하여 L6, S1 척수분절에

서 c-fos 단백질을 항원으로 하는 면역조직화학염색을 시행한 결과 세포핵에서 c-fos 단백질에 대한 양성을 나타내는 갈색의 신경세포 증가를 관찰하였다 (Fig. 4). 결보기 수술군, 생리식염수 주입군, PRV 주입군에서 시행한 면역조직화학검사를 시행한 결과 c-fos 양성 세포수 및 분포에서 차

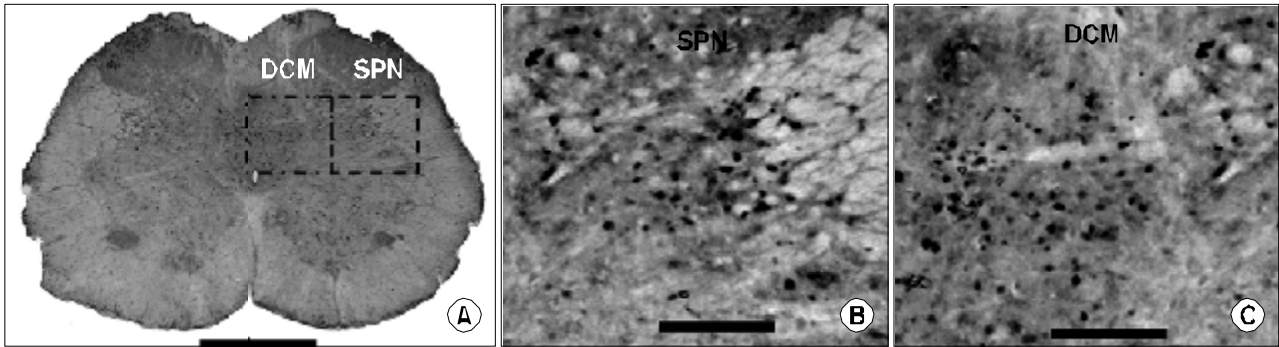


Fig. 4. C-fos expression after AA irritation. Immunohistochemical staining is performed after intravesical irritation of 1% acetic acid for 2 hours. The expressions of c-fos are increased in the SPN and DCM regions. SPN: sacral parasympathetic nucleus, DCM: dorsal commissure (A: x40, B, C: x100) Bar=0.5mm (A) Bar=100µm (B, C).

Table 1. Number of Fos immunoreactive by (IR) cells induced by each group (means±SE)

	Fos-IR, cells/section			
	MDH	LDH	DCM	SPN
Sham operation	15.4±2.5	16.2±2.8	20.5±3.6	15.6±2.7
Saline infusion	17.5±2.1	17.4±3.7	24.2±4.2	16.4±3.1
PRV injection	14.5±3.2	17.2±2.4	18.5±4.5	11.5±2.2
AA infusion	19.7±2.5	18.2±2.7	83.3±8.2*	36.3±3.9*
PRV injection +AA infusion	20.3±3.8	19.2±4.0	87.4±7.1 [†]	35.4±2.7 [†]

*p-value indicates the comparison between saline group and AA group ($p < 0.01$), [†] p-value indicates the comparison between saline group and PRV+AA group ($p < 0.01$). AA: acetic acid, PRV: pseudorabies virus, MDH: medial dorsal horn, LDH: lateral dorsal horn, DCM: dorsal commissure, SPN: sacral parasympathetic nucleus

이를 보이지 않았으며 acetic acid 자극군, PRV 주입 후 acetic acid 자극군 간에도 c-fos 양성세포의 차이는 없었다 (Table 1). 척수 후각을 4개의 지역으로 구분하여 c-fos 양성 세포의 증가를 관찰한 결과 방광 내 acetic acid 주입군 및 PRV 주입 후 acetic acid 주입군에서 생리식염수 주입군에 비해 SPN, DCM에서 유의하게 양성 세포수가 증가하였다 (Table 1).

4. SPN, DCM 위치에서 이중염색을 사용한 신경원의 분류

배뇨반사에서 c-fos 양성 신경원의 증가를 나타낸 SPN 및 DCM에서 c-fos와 PRV, c-fos와 ChAT에 대한 이중 형광염색을 시행하여 SPN 및 DCM 영역에서 배뇨반사에 관여하는 신경원을 세분화하였다. PRV 주입 3일에 acetic acid를 주

입한 흰쥐에서 이중 형광염색을 시행하였으며 면역조직화학염색과 마찬가지로 SPN 및 DCM에서 녹색으로 나타나는 c-fos 양성 세포가 관찰되었고 ChAT 양성 세포의 경우 적색으로 나타났다 (Fig. 5A). C-fos와 PRV 이중형광염색을 하였을 때 c-fos 양성 세포는 녹색으로 나타나고 PRV 양성 세포는 적색으로 나타났으며 동시에 양성을 나타내는 세포는 중심부가 노란색으로 관찰되었다 (Fig. 5B, C).

고 찰

신경추적자로서 pseudorabies virus (PRV)는 신경계 친화성 바이러스로 신경연접을 건너 상위 신경세포체로 이동할 수 있고 이동 시 복제에 의해 점차 그 농도가 증가하여 검출이 용이하다는 장점이 있다.^{7,8} PRV는 원심성신경섬유를 타고 신경세포를 경유하여 역방향으로 전달되는 성질을 가지고 있으며 구심성 신경섬유를 통한 antegrade transport는 매우 느리고 매우 미비하여 척수에서 virus에 의한 interneuron의 감염이 구심성신경섬유를 경유하여 일어난다고 보기는 어렵다.^{9,10} Nadelhaft 등¹¹은 양측 하복신경 및 편측 골반신경을 절제한 쥐의 방광에 PRV를 주입한 후 척수분절과 뇌에서의 virus 감염을 확인해 본 결과 2일이 지나서 제6번 요수분절 및 제1번 천수분절에서 나타나기 시작했으며 3일이 지나서 뇌간에서 확인이 가능하다고 하였다. 본 실험에서는 이러한 PRV의 특성을 이용하여 배뇨근에 관여하는 척수신경에 대한 추적을 한 결과 virus 주입 1.5일에는 PRV 양성 세포가 관찰되지 않았으나 2일에는 SPN 영역에서 양성 세포를 관찰하였고 2일 이후에는 SPN, DCM 및 후각의 superficial laminae에서 뚜렷이 증가하는 양상을 보였다. Choline acetyltransferase를 사용한 면역형광염색에서 preganglionic neuron이 분포하는 영역을 확인하였고 PRV 주입 후 2일에 관찰되던 virus 양성 세포가 preganglionic neu-

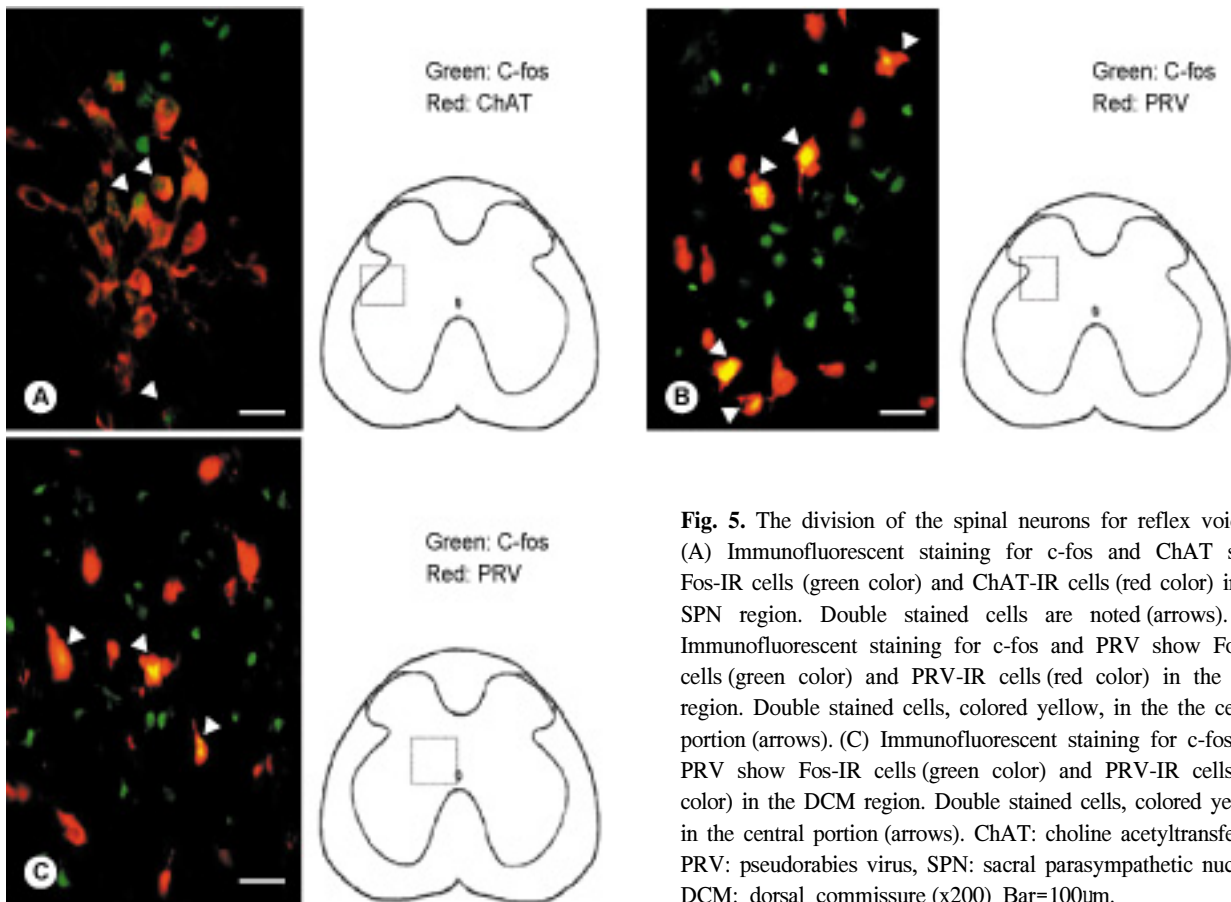


Fig. 5. The division of the spinal neurons for reflex voiding. (A) Immunofluorescent staining for c-fos and ChAT show Fos-IR cells (green color) and ChAT-IR cells (red color) in the SPN region. Double stained cells are noted (arrows). (B) Immunofluorescent staining for c-fos and PRV show Fos-IR cells (green color) and PRV-IR cells (red color) in the SPN region. Double stained cells, colored yellow, in the the central portion (arrows). (C) Immunofluorescent staining for c-fos and PRV show Fos-IR cells (green color) and PRV-IR cells (red color) in the DCM region. Double stained cells, colored yellow, in the central portion (arrows). ChAT: choline acetyltransferase, PRV: pseudorabies virus, SPN: sacral parasympathetic nucleus, DCM: dorsal commissure (x200) Bar=100 μ m.

ron을 감염시킨 것을 알 수 있었다. 이러한 사실은 PRV에 감염된 세포들의 형태나 크기를 통해서도 확인할 수 있으며 정확한 결과를 얻기 위해서는 PRV 및 ChAT 이중형광염색을 하여 동시에 염색되는 세포를 관찰하면 배뇨근에 관여하는 preganglionic neuron을 확인할 수 있을 것이다.

척수의 c-fos gene은 방광의 생리적 상태에서는 발현이 없다가 주로 unmyelinated C fiber에 의해 전달된 침해성 자극이 척수의 감각신경세포에 노출되면 활성화된다.¹² 특히 방광 내 acetic acid 주입은 척수의 c-fos 발현을 증가시키는 대표적인 자극물질로 지속적인 자극 2시간 후에 L6와 S1 척수에서 c-fos 양성 세포를 유의하게 증가시킨다고 한다.³ 본 실험에서는 acetic acid 자극군, PRV 주입 후 acetic acid 자극군 간의 c-fos 발현의 차이가 없었으며 정상대조군 및 PRV 주입군과의 비교에서 c-fos 발현의 차이가 없었다. 즉, virus가 c-fos 발현에 영향을 미치거나 virus 자체가 c-fos를 증가시키지는 않았다. 척수의 c-fos 면역조직화학염색에서 양성을 나타내는 세포의 분포에 따라 medial dorsal horn (MDH), lateral dorsal horn (LDH), dorsal commissure (DCM), sacral parasympathetic nucleus (SPN)로 나눌 수 있는데 화학적 자

극에 의한 c-fos는 DCM 부위에서 3.5배 이상 증가한다.³ 본 실험에서 방광 내 acetic acid 자극 후 요역동학검사를 통한 배뇨반사를 확인하였고 c-fos 양성 세포는 L6와 S1 척수 분절에서 증가하였는데 정상대조군과 비교하여 DCM 영역에서 4.2배, SPN 영역에서 2.3배 정도가 증가하였다. Acetic acid 자극에 의해 활성화된 신경원은 L6, S1 척수분절의 DCM 및 SPN에 위치하고 있으며 이러한 신경원에는 preganglionic neuron, interneuron, projection neuron이 포함되어 있다.

C-fos 양성 신경세포를 뇌로 전달되는 spinal projection neuron, interneuron, preganglionic neuron으로 분리하려는 노력이 시도되었지만 아직까지는 제한점과 한계를 가지고 있다. Vizzard⁵는 척수절단 흰쥐모델 척수의 sacral parasympathetic nucleus (SPN)에서 방광의 구심성신경의 자극으로 활성화된 c-fos와 preganglionic neuron과의 관계를 choline acetyltransferase (ChAT)의 항체를 사용하여 보고하였다. L6 척수분절의 SPN은 preganglionic neuron, 뇌로 전달되는 spinal tract neurons, interneuron 등 다양한 세포를 포함하고 있는 부분으로 ChAT-IR의 preganglionic neuron 중 75.6%에

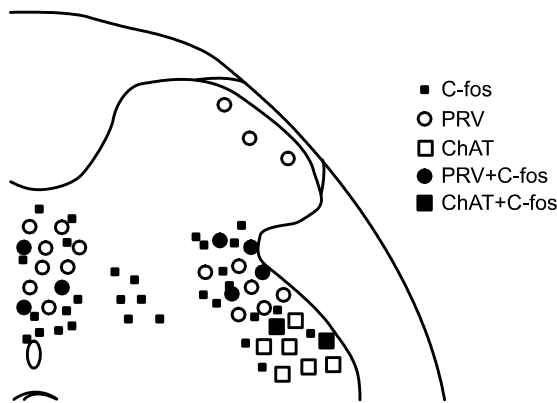


Fig. 6. Distribution of spinal neurons for reflex voiding within the S1 spinal cord, exhibiting the locations of spinal neurons for the voiding reflex. Preganglionic neurons are located in front of the SPN. ChAT and c-fos labeled cells (■) are preganglionic neuron associated with the voiding reflex. C-fos negative cells (□) are preganglionic neuron associated with the other pelvic organs. PRV and c-fos labeled cells (●) are interneuron associated with the voiding reflex. C-fos negative cells (○) are interneuron associated with the detrusor function, with the exception of the voiding reflex. Only c-fos labeled cells (▪) are projection neuron associated with the voiding reflex. SPN: sacral parasympathetic nucleus, ChAT: choline acetyltransferase.

서 fos 양성으로 관찰되었다고 한다. 반면 ChAT에 염색이 되지 않은 신경세포는 interneuron이거나 뇌로 전달되는 projection neuron으로 간주할 수 있는데 이들은 ChAT 양성을 보이는 preganglionic neuron의 dorsal에 위치하는 것을 확인하였다. C-fos와 ChAT를 이용하여 방광과 관련된 신경세포를 보는 방법은 c-fos가 preganglionic neurons에서도 발현됨을 규명할 수 있으나 뇌로 전달되는 projection neuron과 interneuron을 구분하여 볼 수 없는 단점을 가지고 있다. Birder 등⁶은 배뇨와 관련된 척수의 신경세포를 c-fos를 이용하여 뇌로 전달되는 projection neuron, interneuron, preganglionic neuron으로 좀 더 세분화하여 보고하였다. 이 방법은 척수의 신경세포를 3개의 신경세포로 분류할 수 있으나 stereotaxis를 해야 하는 등 방법이 복잡하고 뇌로 전달되는 projection neuron은 pons나 hypothalamus 이외의 장소로도 projection 하기 때문에 interneuron으로 분류된 신경세포 중에는 다수의 projection neuron이 포함되어 있다는 제한점을 가지고 있다. 이외에도 ChAT 항체를 사용한 이중염색을 하게 되면 preganglionic neuron을 interneuron으로부터 구별할 수 있어서 preganglionic neuron의 형태학적 연구에 유용한 정보를 제공하고 있다.^{13,14}

본 실험에서는 acetic acid 자극에 의한 c-fos 양성 신경세포를 preganglionic neuron, interneuron, projection neuron으로

세분화하고 L6, S1 척수분절의 4가지 영역에서 신경세포의 형태학적 특징을 관찰하기 위하여 c-fos, ChAT, PRV에 대한 이중 면역조직화학염색 및 형광염색을 시행하였다. 배뇨근에 관여하는 신경원은 PRV와 ChAT를 이중 형광염색 하였을 때 SPN의 앞쪽 부위에 위치하는 것으로 알 수 있으며 이러한 이중염색에서 동시에 양성을 나타내는 세포는 배뇨근에 관여하는 preganglionic neuron이라고 할 수 있다. 즉, SPN의 preganglionic neuron이 분포하는 위치에서 ChAT 및 PRV에 양성을 나타내는 세포는 배뇨근에 관여하는 preganglionic neuron이며 ChAT에만 양성을 나타내는 세포는 배뇨근 이외의 다른 기관에 관여하는 preganglionic neuron이다. 배뇨반사에 관여하는 신경원들에 대하여 c-fos와 ChAT 이중형광염색을 시행하여 배뇨반사에 관여하는 preganglionic neuron을 확인하였고 PRV 주입 3일에 c-fos와 PRV 이중형광염색을 시행하여 배뇨반사에 관여하는 interneuron을 확인할 수 있었다. C-fos 양성 세포 중 preganglionic neuron 및 interneuron을 제외한다면 projection neuron의 분포를 확인할 수 있으며 본 실험에서도 이러한 이중염색을 통하여 신경원의 분류가 가능하였다 (Fig. 6).

결론

Acetic acid 자극으로 감각신경을 활성화하여 c-fos를 증가시키고, 이를 이중 형광염색하여 배뇨반사에 관여하는 신경원의 분류를 시행한 결과, 배뇨반사에 관여하는 척수 신경원의 분류가 가능하였다. 이러한 배뇨반사를 유발한 흰쥐모델을 통한 실험적 접근은 현재 임상에 적용하고 있는 각종 신경조절 (neuromodulation) 치료의 기전을 규명하는데 있어서 중요한 연구방법을 제시할 것으로 기대한다. 이외에도 방광 이외에 전립선 등과 같은 여러 기관에서 배뇨에 영향을 미치는 기전을 연구하는데 있어서도 동일한 방법을 통한 접근이 가능할 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Blaivas JG. Pathophysiology of lower urinary tract dysfunction. *Urol Clin North Am* 1985;12:215-24
2. Morrison JF, Sato A, Sato Y, Yamanishi T. The influence of afferent inputs from skin and viscera on the activity of the bladder and the skeletal muscle surrounding the urethra in the rat. *Neurosci Res* 1995;23:195-205
3. Birder LA, de Groat WC. Increased c-fos expression in spinal neurons after irritation of the lower urinary tract in the rat. *J Neurosci* 1992;12:4878-89
4. Birder LA, de Groat WC. Induction of c-fos expression in spinal neurons by nociceptive and nonnociceptive stimulation

- of LUT. *Am J Physiol* 1993;265:R326-33
 5. Vizzard MA. Increased expression of spinal cord Fos protein induced by bladder stimulation after spinal cord injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279:R295-305
 6. Birder LA, Roppolo JR, Erickson VL, de Groat WC. Increased c-fos expression in spinal lumbosacral projection neurons and preganglionic neurons after irritation of the lower urinary tract in the rat. *Brain Res* 1999;834:55-65
 7. Card JP, Rinaman L, Schwaber JS, Miselis RR, Whealy ME, Robbins AK, et al. Neurotropic properties of pseudorabies virus: uptake and transneuronal passage in the rat central nervous system. *J Neurosci* 1990;10:1974-94
 8. Card JP, Rinaman L, Lynn RB, Lee BH, Meade RP, Miselis RR, et al. Pseudorabies virus infection of the rat central nervous system: ultrastructural characterization of viral replication, transport, and pathogenesis. *J Neurosci* 1993;13:2515-39
 9. de Groat WC, Kruse MN, Vizzard MA, Cheng CL, Araki I, Yoshimura N. Modification of urinary bladder function after spinal cord injury. *Adv Neurol* 1997;72:347-64
 10. Weiss ML, Chowdhury SI. The renal afferent pathways in the rat: a pseudorabies virus study. *Brain Res* 1998;812:227-41
 11. Nadelhaft I, Vera PL. Central nervous system neurons infected by pseudorabies virus injected into the rat urinary bladder following unilateral transection of the pelvic nerve. *J Comp Neurol* 1995;359:443-56
 12. Birder LA, Roppolo JR, Iadarola MJ, de Groat WC. Electrical stimulation of visceral afferent pathways in the pelvic nerve increases c-fos in the rat lumbosacral spinal cord. *Neurosci Lett* 1991;129:193-6
 13. Nadelhaft I, Miranda-Sousa AJ, Vera PL. Separate urinary bladder and prostate neurons in the central nervous system of the rat: simultaneous labeling with two immunohistochemically distinguishable pseudorabies viruses. *BMC Neurosci* 2002;3:8
 14. Vera PL, Nadelhaft I. Anatomical evidence for two spinal 'afferent-interneuron-efferent' reflex pathways involved in micturition in the rat: a 'pelvic nerve' reflex pathway and a 'sacrolumbar intersegmental' reflex pathway. *Brain Res* 2000;883:107-18
-